

12

**DEMANDE DE BREVET EUROPEEN**

21 Numéro de dépôt: 87402104.1

22 Date de dépôt: 21.09.87

50 Int. Cl.<sup>4</sup>: **C 12 N 15/00**  
**C 07 H 21/04, C 12 N 5/00,**  
**C 12 N 7/00**

30 Priorité: 23.09.86 FR 8613272

43 Date de publication de la demande:  
30.03.88 Bulletin 88/13

84 Etats contractants désignés:  
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

71 Demandeur: **TRANSGENE S.A.**  
16, rue Henri Régnauld  
F-92400 Courbevoie (FR)

72 Inventeur: **Drillien, Robert**  
10, Boulevard Paul Déroulède  
F-67000 Strasbourg (FR)

**Spehner, Danièle**  
25, Rue de la Chénale  
F-67200 Eckbolsheim (FR)

70 Mandataire: **Warcoln, Jacques et al**  
Cabinet Régimbeau 26, avenue Kléber  
F-75116 Paris (FR)

Le microorganisme a été déposé auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes sous le numéro I 594.

54 Séquence d'ADN vecteurs, virus recombinants et procédé mettant en oeuvre des virus de la vaccine recombinants capables de se multiplier dans les cellules CHO.

57 Séquence d'ADN isolée du virus du cowpox qui participe à la multiplication de ce virus dans les cellules CHO, vecteurs, virus recombinants et procédé mettant en oeuvre des virus de la vaccine recombinants capables de se multiplier dans les cellules CHO.

## Description

## SEQUENCE D'ADN, VECTEURS, VIRUS RECOMBINANTS ET PROCEDE METTANT EN OEUVRE DES VIRUS DE LA VACCINE RECOMBINANTS CAPABLES DE SE MULTIPLIER DANS LES CELLULES CHO.

Le virus de la vaccine est de plus en plus employé comme vecteur d'expression dans des cellules animales depuis la mise au point des méthodes propres à ce système (Panicali et Paoletti, 1982 ; Mackett et al., 1982 ; Smith et al., 1983 ; Panicali et al. ; Kiény et al., 1984). La construction de virus recombinants du virus de la vaccine contenant des gènes qui codent pour des protéines d'intérêt médical ou vétérinaire est particulièrement recherchée. La synthèse de la protéine étrangère dont le gène a été intégré dans le génome du virus de la vaccine peut ensuite être obtenue en culture cellulaire in vitro ou après inoculation à un organisme vivant, selon le but poursuivi. Un des avantages du virus de la vaccine et tant que vecteur est sa capacité de se multiplier dans un grand nombre de types cellulaires différents.

Cependant quelques exceptions à cette règle existent et, en particulier, le virus de la vaccine de type sauvage est incapable de se multiplier dans une lignée de cellules d'ovaires de hamster chinois, CHO (Drillien, Spehner et Kirn, 1973). Or les cellules CHO constituent un des systèmes les plus prometteurs pour la synthèse de protéines dans des cellules de mammifères. En effet ces cellules se cultivent facilement, elles ont un temps de génération court et leur génétique est la mieux maîtrisée de tous les systèmes analogues.

La présente invention concerne la modification du virus de la vaccine par l'intégration dans son génome d'un gène étranger qui lui confère la capacité de se multiplier dans les cellules CHO. Le gène apportant cette nouvelle spécificité d'hôte est dérivé du virus du cowpox (ou variole bovine, virus de la vache apparenté au virus de la vaccine) qui est capable de se multiplier dans les cellules CHO. Les génomes du cowpox et du virus de la vaccine sont très proches particulièrement dans les 100.000 paires de bases de la partie centrale de l'ADN (Mackett et Archard, 1979). Cependant le génome du cowpox est plus grand que celui de la vaccine (environ 230.000 pb au lieu de 190.000) et l'information génétique supplémentaire qu'il contient semble résider essentiellement dans ses extrémités. La similitude entre le génome du virus de la vaccine et celui du cowpox permet d'envisager d'employer le cowpox comme vecteur naturellement adapté aux cellules CHO.

Toutefois, le cowpox se multiplie à un titre dix fois inférieur à celui de la vaccine ce qui risque d'entraîner un rendement plus faible de l'expression d'une protéine produite par un recombinant cowpox en comparaison avec un recombinant vaccine. D'autre part dans la perspective de l'utilisation de recombinants viraux pour la vaccination, il faut souligner que l'emploi du virus de la vaccine est bien maîtrisé et a permis à ce jour l'éradication complète la variole.

La présente invention concerne la mise au point d'un vecteur présentant les avantages connus du virus de

la vaccine et la capacité de se multiplier sur cellules CHO du virus du cowpox.

La présente invention concerne, d'abord, l'identification et la localisation de l'information génétique qui confère au virus du cowpox la capacité de se multiplier dans les cellules CHO.

En effet, les études menées ont permis d'identifier une séquence impliquée dans la multiplication du virus cowpox dans les cellules CHO et qui, transférée dans le virus de la vaccine, assure la multiplication de ce virus dans les cellules CHO.

Ainsi, l'invention concerne une séquence d'ADN isolée notamment du virus du cowpox et qui participe à la multiplication de ce virus dans les cellules CHO et qui comprend la totalité ou une partie fonctionnelle de la séquence représentée dans la figure 6 ou une séquence équivalente fonctionnelle.

Il est possible qu'une partie de ce gène soit suffisante pour assurer la fonction de multiplication, on l'appelle "partie fonctionnelle". Il est également possible que des mutations ou des variations ponctuelles ne modifient pas la fonction, on parle alors de "séquence équivalente fonctionnelle".

Bien que l'on préfère que cette séquence d'ADN comporte ses propres signaux de contrôle qui assurent son expression dans les cellules CHO, ceci n'est pas indispensable et l'on peut envisager de la mettre sous le contrôle d'éléments ayant une autre origine.

Comme cela est décrit précédemment, cette séquence d'ADN est plus particulièrement destinée à être intégrée dans le virus de la vaccine pour assurer sa multiplication dans les cellules CHO. Cette intégration s'effectue par recombinaison homologue, il est donc intéressant de prévoir que la séquence d'ADN en cause comportera au moins une région homologue d'une séquence du virus de la vaccine qui pourra participer à ce processus de recombinaison homologue au cours de la multiplication intracellulaire des virus.

En fait, il apparaît que chez le virus cowpox le gène permettant la multiplication dans les cellules CHO est entouré de séquences homologues à des séquences du génome de la vaccine, ce qui permet de simplifier la préparation d'un vecteur plasmidique de recombinaison.

Comme cela est déjà connu pour le virus de la vaccine, il est possible d'insérer dans la séquence d'ADN, objet de l'invention, un gène codant pour une protéine d'intérêt industriel sous la dépendance d'éléments de contrôle assurant son expression dans les cellules hôtes. Cette technologie a déjà été décrite, notamment dans les brevets suivants : 84.06499, 84.07959, 85.09225 et peut être utilisée avec éventuellement certaines adaptations et avantages. En particulier, dans les constructions précédentes, la sélection des virus recombinants était effectuée en insérant le gène à exprimer dans le gène TK de la vaccine, ce qui a pour conséquence

de rendre le virus recombinant TK- et de permettre la sélection par le procédé connu.

Dans le cas présent, il n'est pas indispensable d'effectuer une insertion dans le gène TK car, dans la mesure où le gène codant pour la protéine d'intérêt industriel est lié au gène assurant la multiplication dans les cellules CHO, seuls les virus recombinants peuvent se multiplier sur cellules CHO, ce qui autorise une sélection "naturelle" des virus recombinants.

Dans ce dernier cas, il est préférable que le bloc d'ADN comprenant les gènes à recombinaison soit flanqué de séquences homologues de séquences du virus de la vaccine afin qu'ils restent liés lors de la recombinaison.

La présente invention concerne également les cellules CHO infectées par un virus de la vaccine recombinant incorporant une séquence d'ADN telle que décrite précédemment et, en particulier, un gène codant pour une protéine d'intérêt industriel, ainsi que les virus correspondants.

L'invention concerne également les vecteurs plasmidiques incorporant une séquence d'ADN telle que décrite précédemment, ces vecteurs étant utilisables pour effectuer la recombinaison in vivo.

L'invention concerne également des cellules CHO ayant intégré une séquence d'ADN selon la présente invention et capables d'assurer la multiplication du virus de la vaccine dans ces cellules.

Enfin, l'invention concerne la préparation de protéines d'intérêt industriel par culture de cellules CHO infectées par un virus recombinant selon l'invention.

Les exemples ci-après sont destinés à illustrer d'autres caractéristiques et avantages de la présente invention.

**Exemple 1** Identification de la région du génome du virus du cowpox qui permet la multiplication dans les cellules CHO.

Des recombinants entre le virus de la vaccine et le cowpox ont été sélectionnés après infection mixte de cellules d'embryons de poulet avec chacun des virus. L'analyse de l'ADN des recombinants montre que la capacité de se multiplier dans des cellules CHO est associée à la conservation des sites de restriction de l'extrémité gauche du génome du cowpox.

Des cellules primaires d'embryon de poulet, préparées à partir d'oeufs embryonnés de 11 à 12 jours, sont infectées simultanément avec un mutant thermosensible du virus vaccinal, tsN7 (Drillien et al., 1982) et le cowpox (souche Brighton) à raison de 2 unités formant plaque (ufp) par cellule. Parallèlement d'autres tapis cellulaires sont infectés avec chacun de ces virus. Après une heure d'adsorption l'excès de virus non adsorbé est éliminé et du milieu frais est ajouté aux cellules.

Celles-ci sont incubées à 33°C pendant un à deux jours jusqu'à la nécrose totale de la couche cellulaire. Les cellules infectées sont alors congelées puis décongelées et le virus issu de l'infection est titré à 39,5°C sur cellules d'embryon de poulet, sous une couche de milieu contenant 1% d'agar noble. Après deux jours à 39,5°C un plus grand

nombre de plages de virus s'est formé sur les tapis cellulaires infectés avec le mélange des 2 virus que sur les tapis témoins (ni le mutant thermosensible du virus de la vaccine ni le cowpox ne donnent un nombre significatif de plages) ; les plages qui apparaissent à partir de l'infection mixte peuvent donc correspondre à des recombinants entre le cowpox et le virus de la vaccine.

Les plages de recombinants potentiels sont reprises individuellement et le virus qu'elles contiennent est amplifié par multiplication sur cellules d'embryon de poulet. Leur ADN est ensuite purifié, coupé par des enzymes de restriction puis analysé sur gel d'agarose.

Les profils de restriction permettent de déduire que chaque plage correspond effectivement à un recombinant entre l'ADN du virus de la vaccine et l'ADN du cowpox. Grâce aux cartes de restriction connues pour les virus parentaux (Mackett and Archard 1978, Drillien and Spelner 1983) il est possible de reconnaître l'origine de la plupart des fragments des recombinants et de dresser leurs cartes de restriction (figure 1).

On voit que les recombinants dénommés 4, 6, 14, 15 et 19 qui sont capables de se multiplier dans des cellules CHO ont conservé les sites caractéristiques de l'extrémité gauche du génome du cowpox. Les autres recombinants dénommés 2, 7, 11, 16 et 18 qui sont incapables de se multiplier dans des cellules CHO ne possèdent que partiellement ou pas du tout ces sites de l'extrémité gauche du génome du cowpox.

Il ressort de ces résultats que la conservation des sites de restriction de l'extrémité gauche du génome du cowpox est associée au phénotype de multiplication sur cellules CHO.

**Exemple 2** Isolement et analyse du génome de recombinants du virus de la vaccine ayant intégré un fragment d'ADN du cowpox.

Pour mieux préciser la localisation de l'information génétique utile, des recombinants capables de se multiplier sur cellules CHO ont été sélectionnés après infection avec le virus de la vaccine et transfection avec des fragments d'ADN du cowpox.

Les fragments de restriction utiles à l'analyse de la partie importante, c'est-à-dire l'extrémité gauche des 2 virus sont représentés dans la figure 2 ; c'est dans cette partie du génome que l'on peut soupçonner qu'interviennent les événements de recombinaison décrits dans l'exemple 1.

Des cellules primaires d'embryon de poulet sont infectées avec le mutant tsN7 du virus de la vaccine (Drillien et al., 1982) à raison de 0,1 ufp par cellule et transfectées avec un mélange d'ADN intact de la souche sauvage du virus de la vaccine (souche Copenhagen) et de l'ADN du cowpox (souche Brighton) préalablement digéré avec l'enzyme HindIII. Des témoins de transfection sans ADN ou avec seulement l'ADN du virus de la vaccine sont réalisés. Après 48 heures d'incubation à 39,5°C les cellules sont congelées, décongelées puis le virus ainsi libéré est titré sur une monoclone de cellules CHO qui sont ensuite recouvertes de milieu contenant 1% d'agar.

Les échantillons provenant de cellules transfectées avec l'ADN du cowpox donnent de nombreuses plaques de lyse sur cellules CHO tandis que les échantillons témoins n'en donnent aucune.

Les plaques visibles sur cellules CHO sont reprises individuellement et le virus qu'elles contiennent est amplifié sur cellules d'embryon de poulet. Leur ADN est ensuite extrait et analysé en comparaison avec l'ADN des 2 souches parentales de vaccine et de cowpox. Après digestion par l'enzyme EcoRI, les fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose puis ils sont transférés à un filtre de nitrocellulose et hybridés au fragment Sall-K du virus de la vaccine marqué radioactivement au <sup>32</sup>P.

Après lavage de la nitrocellulose pour enlever la radioactivité fixée de manière spécifique une autoradiographie est réalisée. L'autoradiographie (figure 3) montre que les recombinants du virus de la vaccine ayant intégré un fragment du cowpox ont perdu le fragment EcoRI-C typique du virus de la vaccine et comportent un fragment EcoRI qui s'hybride avec le fragment radioactif Sall-K de la vaccine ; ce fragment est intermédiaire en taille entre le fragment EcoRI-A du cowpox et le fragment EcoRI-C du virus de la vaccine.

Ce nouveau fragment EcoRI hybride cowpox-vaccine, présent dans tous les recombinants, provient d'une double recombinaison entre le fragment EcoRI-A du cowpox et le fragment EcoRI-C de la vaccine et doit renfermer l'information nécessaire pour la multiplication dans des cellules CHO. Pour que cette recombinaison ait pu se produire il fallait que l'information permettant la multiplication sur cellules CHO soit entourée de part et d'autre par des séquences du génome du cowpox homologues à des séquences du génome vaccine.

**Exemple 3 Construction d'un plasmide recombinant portant la région du génome du cowpox qui permet la multiplication dans des cellules CHO.**

Afin d'isoler l'information génétique permettant la multiplication dans des cellules CHO le fragment EcoRI-A de l'un des recombinants décrits dans l'exemple 2 a été cloné dans le plasmide bactérien pAT153 (Twigg et Sherratt, 1980).

L'ADN d'un des recombinants décrits dans l'exemple 2 est purifié puis coupé avec l'enzyme EcoRI. Le fragment EcoRI-A est élué d'un gel d'agarose puis inséré dans le plasmide pAT153 préalablement soumis à l'action d'EcoRI. Des bactéries HB101 sont transformées avec le mélange de ligation puis l'ADN des colonies obtenues est transféré sur nitrocellulose et hybridé au fragment Sall-K du virus de la vaccine. Les colonies positives à l'hybridation sont amplifiées et l'ADN plasmidique qu'elles contiennent est purifié. Deux plasmides ont été retenus : pEA1 et pEA2, qui correspondent à l'insertion du fragment EcoRI-A dans les deux orientations opposées dans le vecteur pAT153.

Pour vérifier que ces plasmides portent l'information génétique permettant la multiplication du virus sur cellules CHO on provoque une recombinaison entre l'insert d'ADN du plasmide et un virus de la vaccine : des cellules d'embryons de poulets sont

infectées avec le mutant thermosensible du virus de la vaccine tsN7 à raison de 0,1 upf par cellule puis transfectées avec l'ADN du virus de la vaccine sauvage et avec l'ADN du plasmide pEA1 ou pEA2. Des témoins sans ADN du virus de la vaccine ou sans plasmide sont également réalisés. Après 48 heures d'incubation à 39,5°C, les cellules sont congelées puis décongelées et le virus issu de l'infection est titré sur cellules CHO. Seuls les échantillons provenant de cellules transfectées avec l'ADN du virus de la vaccine et les plasmides pEA1 ou pEA2 donnent des plaques sur cellules CHO.

**Exemple 4 Sous-clonage de fragments de plus petite taille du pEA1 dans un plasmide vecteur destiné à la recombinaison avec le virus de la vaccine.**

Pour affiner la localisation de l'information génétique permettant la multiplication dans des cellules CHO, des fragments de restriction recouvrant des portions réduites du plasmide pEA1 ont été clonés dans un plasmide portant le gène thymidine kinase (TK) du virus de la vaccine : pTG186poly.

**- Construction de pTG186poly :**

Le fragment HindIII (Hin-J) du génome du virus de la vaccine (VV) contient le gène complet de la thymidine kinase (TK) qui a déjà été utilisé précédemment pour permettre l'échange et la recombinaison d'un fragment d'ADN étranger dans le génome de VV (Mackett et al., 1982).

Il est important de noter que le transfert d'un insert dans le gène TK du génome de VV crée un virus TK déficient ce qui facilite sa sélection.

Il a tout d'abord été nécessaire de produire un plasmide de petite taille portant un site unique HindIII utilisable pour l'intégration du fragment Hin-J de VV. En outre, il était nécessaire d'éliminer les sites de restriction non nécessaires du plasmide, de façon à permettre les manipulations ultérieures.

La construction a été amorcée à partir du plasmide pML2 (Lusky et Botchan, 1981) qui est un vecteur dérivé du plasmide pBR322 dans lequel le segment compris entre les nucléotides 1089 et 2491 a été perdu par délétion spontanée. D'abord la séquence de PstI a été éliminée par insertion du fragment AhaII-AhaII de pUC8 (Vieira et Messing, 1982) entre deux sites AhaII de pML2 en éliminant 19 paires de bases.

On a utilisé la méthode du "linker-tailing" (Lathe et al., 1984) pour insérer un adaptateur HindIII entre les sites NruI et EcoRI traité par S1 de ce plasmide, en éliminant le site BamHI. Ceci conduit à un plasmide de 2049 paires de bases portant le gène  $\beta$ -lactamase fonctionnel (conférant la résistance à l'ampicilline) et comportant en outre une origine de réplication active dans E. coli et un site de restriction unique HindIII. Cette construction a été appelée pTG1H.

Le fragment Hin-J de l'ADN de VV portant le gène TK a préalablement été cloné dans le vecteur pAT153 (Drillien et Spohner, 1983). Ce fragment de 4,6 kb a été reclone dans le site HindIII de pTG1H. Un clone a été sélectionné dans lequel le gène TK est situé distalement par rapport au gène codant pour la résistance à l'ampicilline. Cette construction a été

appelée pTG1H-TK.

La construction pTG1H-TK a été utilisée comme vecteur pour les constructions suivantes.

L'étape suivante a été d'isoler un promoteur de VV utilisable pour commander l'expression du gène étranger à intégrer dans VV. Le promoteur d'un gène précoce codant pour une protéine de 7500 daltons (7,5 K) a déjà été utilisé avec succès dans un but identique (Smith et al., 1983) et on a donc procédé à l'isolement de ce segment.

Le gène 7,5 K est situé sur l'un des plus petits fragments Sall (fragment Sal-S) du génome de VV type WR (Venkatasen et al., 1981). Comme les petits fragments sont clonés de façon préférentielle, une grande proportion des clones obtenus par clonage direct de l'ADN de VV type WR coupé par Sall dans le plasmide pBR322 porte le fragment Sal-S. Ce fragment est transféré sur le bactériophage vecteur M13mp701 (Kiery et al., 1983), par digestion Sall et religation, ce qui donne le phage M13.TG.Sal-S.

Dans ce clone, un site Scal se trouve immédiatement à proximité de l'ATG d'initiation du gène 7,5 K. En aval du gène 7,5 K se trouvent situés des sites uniques BamHI et EcoRI provenant du vecteur. Les sites BamHI et Scal sont fusionnés par l'intermédiaire d'un adaptateur BglII : 5'-CAGATCTG-3' après avoir complété les extrémités générées par digestion BamHI avec le fragment Klenow de la polymérase de E. coli. Ce procédé élimine le site Scal mais reconstitue le site BamHI et déplace le site unique EcoRI en aval. En même temps, le site Sall (AcoI) en aval est éliminé et le site Sall en amont devient donc unique. Cette construction est appelée M13.TG.7,5K.

A l'intérieur du fragment Hin-J de l'ADN de VV se trouvent situés des sites ClaI et EcoRI qui sont séparés par environ 30 paires de bases (Weir et Moss, 1983). Le fragment promoteur de 7,5 K présent dans M13.TG.7,5K est excisé par AcoI et EcoRI et cloné entre les sites ClaI et EcoRI de pTG1H-TK pour générer pTG1H-TK-P7,5K.

Dans cette construction les sites BamHI et EcoRI uniques du vecteur M13 se retrouvent immédiatement en aval de la séquence du promoteur 7,5 K. Ces sites uniques BamHI et EcoRI seront utilisés dans la construction suivante.

Le segment polylinker du bactériophage M13TG131 (Kiery et al., 1983) est excisé par EcoRI et BglII et inséré entre les sites EcoRI et BamHI du plasmide pTG1H-TK-P7,5K, générant le pTG186poly. Dans cette construction, 5 sites de restriction sont disponibles pour le clonage d'un gène étranger sous le contrôle du promoteur P7,5K : PstI, BamHI, SstI, SmaI et EcoRI.

- Insertion de fragments du pEA1 dans pTG186poly :

Le fragment EcoRI du plasmide pEA1 a été digéré par différentes enzymes et des fragments de différentes tailles ont été insérés dans le pTG186poly.

Les plasmides recombinants dérivés de pTG186poly et contenant des portions du fragment EcoRI-A du plasmide recombinant pEA1 sont représentés dans la figure 4.

La coupure du plasmide pEA1 avec l'enzyme BglII

donne plusieurs fragments. Le plus grand des fragments BglII a été inséré dans le site BamHI du vecteur pTG186poly pour donner les plasmides pEA5a et pEA5b qui se distinguent par l'orientation de l'insertion.

Le plasmide pEA6 est dérivé du plasmide pEA5a par coupure de ce dernier avec l'enzyme PstI puis recircularisation du plus grand fragment ce qui a pour effet de délétér le petit fragment BglII-PstI du plasmide pEA5a.

Le plasmide pEA7 provient de pEA6 après coupure de ce dernier avec l'enzyme ClaI et recircularisation du grand fragment obtenu ce qui donne une délétion du petit fragment ClaI.

Le plasmide pEA8 provient de pEA6 après coupure de ce dernier par SphI puis recircularisation du grand fragment ce qui donne une délétion du fragment SphI-BglII de droite.

Le plasmide pEA9 provient du plasmide pEA5b après coupure de ce dernier par SphI puis religation ce qui donne une délétion du fragment gauche SphI-BglIII.

Le plasmide pEA36 a été construit en deux étapes. D'abord le petit fragment HpaI a été isolé du plasmide pEA9 et il a été inséré dans le site SmaI du vecteur M13-130. Puis le fragment HpaI a été sorti du vecteur M13-130 grâce aux sites EcoRI et PstI et il a été intégré dans les sites EcoRI et PstI du vecteur pTG186poly.

Chacun de ces plasmides a été utilisé dans une expérience de transfection de manière à transférer l'insertion qui se trouve dans le gène TK porté par le plasmide au génome du virus de la vaccine, selon la méthode décrite dans l'exemple 3.

Les plasmides capables de conférer la capacité de multiplication dans des cellules CHO au virus de la vaccine sont pEA1, 2, 5a, 5b, 6, 9, 36.

Le plus petit fragment ayant cette propriété est porté par le plasmide pEA36. Il comprend 2004 paires de bases.

Exemple 5 Séquençage du gène permettant la multiplication du virus de la vaccine dans les cellules CHO.

L'ADN du cowpox porté par le plasmide pEA36 et situé entre les sites HpaI a été entièrement séquencé selon la méthode des didéoxynucléotides (Sanger et al. 1980) après insertion des plus petits fragments dans les phages M13-130 et M13-131 (Kiery et al. 1983) en suivant la stratégie schématisée dans la figure 5.

Le cadre de lecture pouvant coder pour une protéine de 77.000 daltons débute aux nucléotides ATG et se termine aux nucléotides TAA représentés sur la carte de la figure 5. Les flèches en-dessous de la carte indiquent l'endroit où commence la lecture de chaque clone, la longueur de la lecture et sa direction. Lorsque le début de lecture ne commence pas à un site de restriction, des amorces constituées d'oligonucléotides synthétiques déduits d'une séquence partielle ont été utilisées.

La séquence complète du gène ainsi que la séquence de la protéine de 77.000 daltons pour laquelle il peut coder est présentée dans la figure 6.

**Exemple 6** Recombinaison homologue et intégration du gène du cowpox dans l'ADN de la vaccine, en dehors du gène TK.

Parmi les virus recombinants, décrits dans l'exemple 4, capables de se multiplier sur cellules CHO, on constate que certains sont TK<sup>+</sup> et d'autres TK<sup>-</sup>.

Par exemple dans la transfection des cellules avec le plasmide pEA9, sur 27 plaques de virus recombinants sélectionnées pour leur multiplication sur CHO, 16 étaient TK<sup>-</sup> et 11 TK<sup>+</sup>.

La recombinaison introduisant l'information qui permet la multiplication dans des cellules CHO s'est donc produite dans une région différente de celle du gène qui code pour la thymidine kinase.

Ce résultat implique la possibilité de sélection pour l'insertion d'un gène étranger dans une région du génome autre que le gène TK, simultanément à la sélection pour la multiplication sur cellules CHO. Il suffit pour cela de juxtaposer le gène choisi et le gène permettant la croissance sur cellules CHO. L'insertion de ce dernier par recombinaison homologue avec le génome du virus de la vaccine entraînera la co-intégration du gène étranger.

**Dépôt de souche représentative de l'invention.**

La souche de *E. coli* 1106 portant le plasmide pEA36 a été déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes sous le n° 1594, le 2 septembre 1986.

Le plasmide pEA36 porte un fragment d'ADN de 2.004 pb du virus du Cowpox qui permet la multiplication du virus dans les cellules CHO ; ce fragment d'ADN est destiné à la recombinaison in vivo avec le virus de la vaccine (qui ne se multiplie pas dans les cellules CHO). Par transfection des cellules avec l'ADN plasmidique et co-infection avec le virus de la vaccine, on pourra sélectionner des virus recombinants de la vaccine qui ont acquis la capacité de se multiplier sur cellules CHO.

## REFERENCES

- Drillien, R., Spehner, D. & Kirn, A. J. Virol. 28, 843-850 (1978).  
 Drillien, R., Spehner, D. & Kirn, A. Virology 119, 372-381 (1982).  
 Drillien, R. & Spehner, D. Virology 131, 385-393 (1983).  
 Kierny, M.P., Lathe, R. & Lecocq, J-P. Gene 26, 91-99 (1983).  
 Kierny, M.P., Lathe, R., Drillien, R., Spehner, D., Skory, S., Schmitt, D., Wiktor, T., Koprowski, H. & Lecocq, J-P. Nature 312, 163-166 (1984).  
 Lathe, R., Kierny, M.P., Schmitt, D., Curtis, P. and Lecocq, J-P. J. Molec. Appl. Genet. 2, 331-342 (1984).  
 Lusky & Botchan Nature 293, 79-81 (1981).  
 Mackett, M. & Archard, L.C. (1979) J. Gen. Virol. 45, 683-701 (1979).  
 Mackett, M., Smith, G.L. & Moss, B. P.N.A.S. (USA) 79, 7415-7419 (1982).  
 Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J. "Molecular Cloning : A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1982).  
 Moss, B. In "Virology" (B.N. Fields, ed.) pp. 685-703.

Raven Press, New York.

- Panicali, D. & Paoletti, E. P.N.A.S. (USA) 79, 4927-4931 (1982).  
 Panicali, D., Davis, S.W., Weinberg, R.L. & Paoletti, E. P.N.A.S. (USA) 80, 5364-5368 (1983).  
 Sanger, F.S., Nicklen, S. and Coulson, A.R. P.N.A.S. (USA) 74, 5463-5467 (1977).  
 Smith G.L., Mackett, M. & Moss, B. Nature 302, 490-495 (1983).  
 Smith, G.L., Murphy, B.R. & Moss, B. P.N.A.S. (USA) 80, 7155-7159 (1983).  
 Twigg, A.J. & Sherratt, D. Nature 283, 216-218 (1980).  
 Venkatesan, S., Baroudy, B.M. & Moss, B. Cell 25, 805-813 (1981).  
 Viera and Messing Gene 19, 259-268 (1982).  
 Weir, J.P. & Moss, B. J. Virol. 46, 530-537 (1983).

## Légende des figures

**Figure 1** Cartes de restriction de l'ADN de recombinants entre le virus de la vaccine et le cowpox.

Les quatre lignes horizontales supérieures représentent les cartes de restriction du virus de la vaccine (VV) et du cowpox (CP) obtenues après coupure avec les enzymes HindIII et XhoI. Les dix lignes horizontales suivantes représentent les génomes des recombinants isolés selon l'exemple 1 entre le VV et le CP. Les sites de restriction notés avec une flèche sont des sites caractéristiques du génome du cowpox ; ceux notés avec un trait vertical sont caractéristiques du génome du virus de la vaccine. Les sites communs aux deux génomes ne sont pas notés. Les pointillés indiquent des régions d'incertitude dans la détermination.

**Figure 2** Cartes de restriction de l'extrémité gauche des virus de la vaccine (VV) et du cowpox (CP) après coupure avec les enzymes EcoRI, HindIII et SalI.

Les fragments sont notés conventionnellement A, B, C, ..., par ordre de taille décroissant.

**Figure 3** Caractérisation des profils de restriction de l'ADN des recombinants entre le virus de la vaccine et le cowpox.

L'ADN du virus de la vaccine (VV), du cowpox (CP) et de quatre recombinants appelés rec2, rec3, rec4 et rec6, isolés selon l'exemple 2, a été préparé à partir de cellules d'embryon de poulet infectées en présence de thymidine <sup>3</sup>H. La partie A de la figure présente une autoradiographie des fragments obtenus après digestion de l'ADN avec EcoRI, séparation des fragments sur gel d'agarose et autoradiographie du gel sec pendant quinze jours d'exposition. En B, l'ADN traité de la même manière qu'en A a été transféré sur nitrocellulose et hybridé à une sonde SalI-K portée par le plasmide pAT153.

**Figure 4** Plasmides recombinants contenant des portions du fragment EcoRI du plasmide pEA1 intégrés dans le vecteur pTG188poly.

Les deux lignes horizontales supérieures représentent l'extrémité gauche de l'ADN du virus de la vaccine et du cowpox avec les sites de restriction

pour l'enzyme EcoRI. La troisième ligne est une représentation linéaire du plasmide pEA1 avec le fragment EcoRI-A en trait continu et le plasmide pAT153 en trait discontinu.

Les lignes suivantes sont des représentations linéaires des différents plasmides recombinants avec le fragment dérivé de pEA1 en trait continu et le vecteur pTG186poly en traits discontinus ; le promoteur du gène 7.5 K est symbolisé par une flèche ouverte qui donne le sens de la transcription.

Les sites de restriction sont symbolisés par les lettres suivantes :

B BglII  
C ClaI  
E EcoRI  
H HapI  
P PstI  
S SalI  
Sp SphI  
X XhoI

Figure 5 Stratégie de séquençage du gène permettant la multiplication dans des cellules CHO.

La ligne horizontale en trait gras représente le fragment d'ADN séquencé et compris entre les sites HpaI (H1). Les autres sites de restriction sont symbolisés par les lettres suivantes S (Sau3A), H2 (Hpa2), X (XhoI), C (ClaI), Xb (XbaI). Le cadre de lecture pouvant coder pour une protéine de 80.000 daltons débute aux nucléotides ATG et se termine aux nucléotides TAA portés sur la carte. Les flèches en-dessous de la carte indiquent l'endroit où commence la lecture de chaque clone, la longueur de la lecture et sa direction.

Figure 6 Séquence du gène permettant la multiplication dans les cellules CHO.

## Revendications

1. Séquence d'ADN isolée notamment du virus du cowpox et qui participe à la multiplication de ce virus dans les cellules CHO, et qui comprend la totalité ou une partie fonctionnelle de la séquence représentée dans la figure 6 ou une séquence équivalente fonctionnelle.

2. Séquence d'ADN selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comporte en outre ses propres signaux de contrôle qui assurent son expression dans les cellules CHO.

3. Séquences d'ADN selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins une région homologue d'une région du virus de la vaccine qui peut participer à un processus de recombinaison homologue au cours de la multiplication intracellulaire des virus.

4. Séquence d'ADN selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle comporte, en outre, un gène codant pour une protéine d'intérêt industriel.

5. Séquence d'ADN selon la revendication 4, caractérisée en ce que le gène codant pour une

protéine d'intérêt industriel est placé sous des signaux de contrôle de poxvirus, assurant son expression dans les cellules CHO.

6. Séquence d'ADN selon l'une des revendications 4 et 5, caractérisée en ce que les extrémités de cette séquence comportent des régions homologues de régions du virus de la vaccine pouvant assurer une recombinaison.

7. Vecteur plasmidique comportant une séquence d'ADN selon l'une des revendications 1 à 6.

8. Virus recombinant de la vaccine comportant une séquence d'ADN selon l'une des revendications 1 à 6.

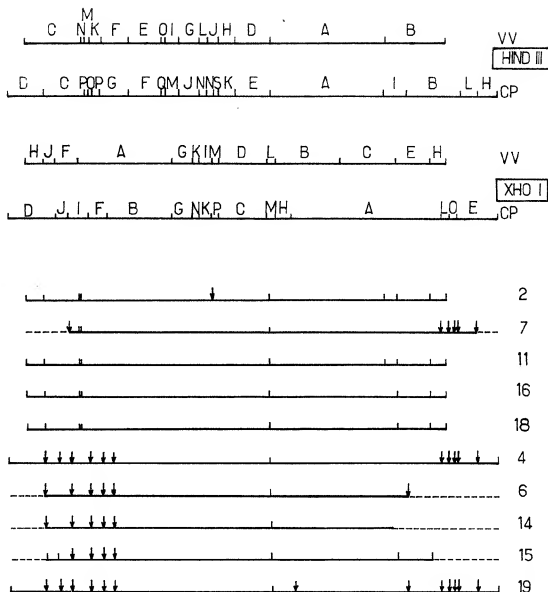
9. Cellules CHO infectées par un virus recombinant de la vaccine selon la revendication 8.

10. Procédé de préparation d'une protéine d'intérêt industriel caractérisé en ce qu'on cultive des cellules CHO selon la revendication 9 infectées par un virus recombinant de la vaccine comportant un gène codant pour une protéine d'intérêt industriel, ledit gène étant sous le contrôle d'éléments assurant son expression dans les cellules CHO.

11. Cellules CHO transformées ayant intégré une séquence d'ADN selon l'une des revendications 1 à 6.

12. Cellules CHO selon la revendication 11, caractérisées en ce qu'elles permettent la multiplication du virus de la vaccine.

0262043



FIG\_1



0262043

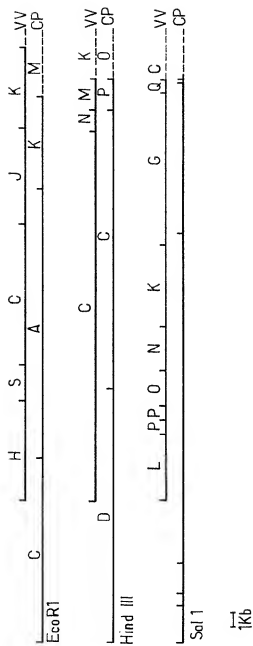


FIG-2

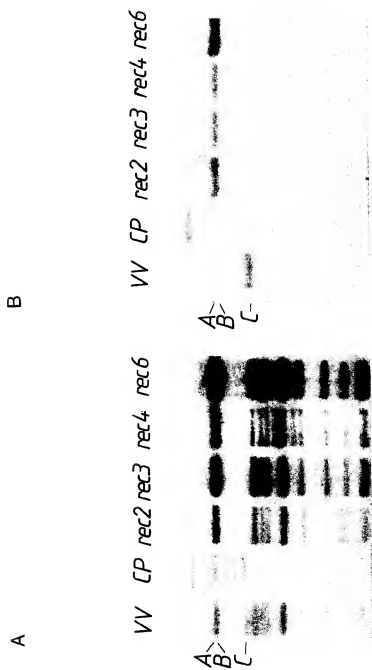


FIG-3

0262043

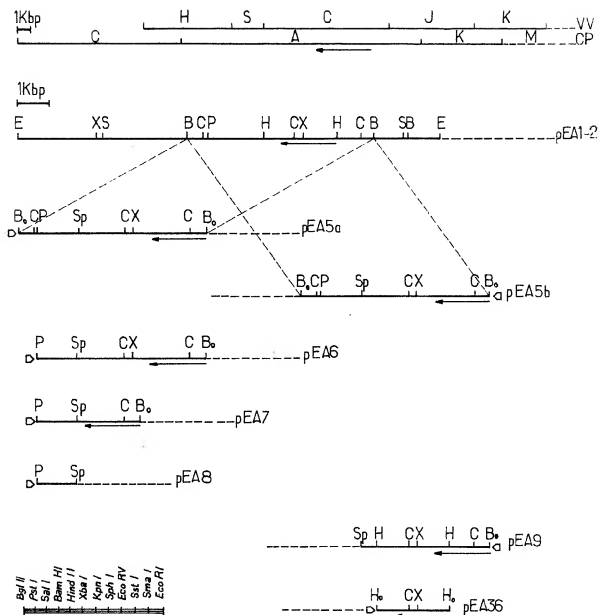
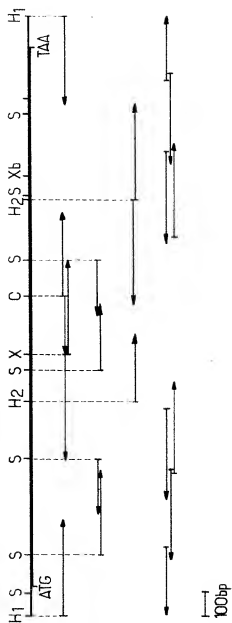


FIG-4

0262043



FIG\_5

30 90  
 GTG TTA ACE GAG GTG TAA ACT CTG SAS TTA ATA AAA TTT AAA CAC TAA ATT ATT TTT TAT TAA TAA TTG TAC AAG TTT TTG ATC TGG TAT  
 120 150 180  
 AAA TAC ATT CAA AAA TGA TAA TTT AAT GAC ATT ACT TGT GCG GGT GTA TAG AGT TCA CAG TAG CTC ATT CAC TTC TAT TCA GTC AAA ATG  
 Met  
 210 240 270  
 TTT GAT TAT CTG GAA AAT GAG SAS GTG GCT CTC GAT GAA CTT AAA CAG ATG TTG AGA GAT AGA GAT CCT AAT GAT ACC AGG AAC CAA TTC  
 Phe Asp Tyr Leu Glu Asn Glu Val Ala Leu Asp Glu Val Met Leu Arg Asp Arg Asp Pro Asn Asp Thr Arg Asn Glu Phe  
 300 330 360  
 AAG AAT AAT GCT CTA CAT GCA TAC CTT TTC AAT GAG CAC TGT AAT AAT GTT GAG GTT GTC AAA CTA CTA CTA GAC AGT GGT ACT AAT CCA  
 Lys Asn Asn Ala Leu His Ala Tyr Leu Phe Asn Glu His Cys Asn Asn Val Glu Val Lys Leu Leu Asp Ser Gly Thr Asn Pro  
 390 420 450  
 TTA CAC AAA AAT TGG AGA CAG CTT ACT CCA TTA GGG GAA TAC ACA AAT AGT AGA CAT GGT AAA GTT AAT AAG GAT ATA GCG ATG GTT CTA  
 Leu His Lys Asn Trp Arg Glu Leu Thr Pro Leu Gly Tyr Thr Asn Ser Arg His Lys Val Asn Lys Asp Ile Ala Met Val Leu  
 480 510 540  
 CTA GAA GCT ACT GGA TAT AGC AAC ATA AAT GAC TTT AAT ATA TTC ACC TAT ATG AAA TCC AAA AAT GTA GAT ATT GAC TTG ATA AAG GTA  
 Leu Glu Ala Thr Gly Tyr Ser Asn Ile Asn Asp Phe Asn Ile Phe Thr Tyr Met Lys Ser Lys Asn Val Asp Ile Asp Leu Ile Lys Val

---

 FIG-6

570  
 TTG GTA GAA CAT GGA TTT GAT TTT AGT GTT AAA TGC GAA AAA CAT CAT TCA GTT ATA GAA AAT TAT GTA ATG ACA GAT GAT CCT GTT CCT  
 Leu Val Glu His Gly Phe Asp Phe Ser Val Lys Cys Glu Lys His Ser Val Ile Glu Asn Tyr Val Met Thr Asp Asp Pro Val Pro

630  
 GAA ATT ATT GAT TTA TTC ATA GAA AAT GGA TGC AGT GTT ATT TAT GAG GAC GAG GAT GAT GAG TAC GGA TAC GCG TAT GAA GAA TAT CAC  
 Glu Ile Ile Asp Leu Phe Ile Glu Asn Gly Cys Ser Val Ile Tyr Glu Asp Glu Asp Asp Glu Tyr Gly Tyr Ala Tyr Glu Glu Tyr His

690  
 TCA CAA AAT GAC GAT TAT CAA CCA CAT TGC GGT ACA GTA TTA CAT CTG TAT ATC ATC TCT CAT CTG TAT TCA GAG TCG GAT TCG AGA  
 Ser Glu Asn Asp Asp Tyr Glu Pro Arg Asn Cys Gly Thr Val Leu His Leu Tyr Ile Ile Ser His Leu Tyr Ser Glu Ser Asp Arg

750  
 TCA TGT GTG AAC CCG GAA GTT GTT AAA TGT CTG ATT AAT CAT GGA ATC AAC CCA TCT TCT ATA GAT AAA AAC TAT TGT ACA GCT CTT CAA  
 Ser Cys Val Asn Pro Glu Val Val Lys Cys Leu Ile Asn His Gly Ile Asn Pro Ser Ser Ile Asp Lys Asn Tyr Cys Thr Ala Leu Glu

810  
 TAT TAT ATT AAG TCA TCT CAT ATA GAT ATA GAC ATC GTT AAA TTG TTA ATG AAA GGA ATA GAT AAC ACG GCT TAT TCA TAT ATA GAC GAT  
 Tyr Tyr Ile Lys Ser Ser His Ile Asp Ile Asp Ile Val Lys Leu Leu Met Lys Gly Ile Asp Asn Thr Ala Tyr Ser Tyr Ile Asp Asp

870  
 CTA ACA TGT TGT ACT CCA GGA ATT ATG GCT GAT TAT CTA AAT AGT GAT TAT AGA TAC AAT AAA GAT GTA GAT TTA GAT TTG GTC AAA TTG  
 Leu Thr Cys Cys Thr Arg Gly Ile Met Ala Asp Tyr Leu Asn Ser Asp Tyr Arg Tyr Asn Lys Asp Val Asp Leu Asp Leu Val Lys Leu

930  
 TAT TAT ATT AAG TCA TCT CAT ATA GAT ATA GAC ATC GTT AAA TTG TTA ATG AAA GGA ATA GAT AAC ACG GCT TAT TCA TAT ATA GAC GAT  
 Tyr Tyr Ile Lys Ser Ser His Ile Asp Ile Asp Ile Val Lys Leu Leu Met Lys Gly Ile Asp Asn Thr Ala Tyr Ser Tyr Ile Asp Asp

990  
 CTA ACA TGT TGT ACT CCA GGA ATT ATG GCT GAT TAT CTA AAT AGT GAT TAT AGA TAC AAT AAA GAT GTA GAT TTA GAT TTG GTC AAA TTG  
 Leu Thr Cys Cys Thr Arg Gly Ile Met Ala Asp Tyr Leu Asn Ser Asp Tyr Arg Tyr Asn Lys Asp Val Asp Leu Asp Leu Val Lys Leu

1050  
 TAT TAT ATT AAG TCA TCT CAT ATA GAT ATA GAC ATC GTT AAA TTG TTA ATG AAA GGA ATA GAT AAC ACG GCT TAT TCA TAT ATA GAC GAT  
 Tyr Tyr Ile Lys Ser Ser His Ile Asp Ile Asp Ile Val Lys Leu Leu Met Lys Gly Ile Asp Asn Thr Ala Tyr Ser Tyr Ile Asp Asp

1060  
 CTA ACA TGT TGT ACT CCA GGA ATT ATG GCT GAT TAT CTA AAT AGT GAT TAT AGA TAC AAT AAA GAT GTA GAT TTA GAT TTG GTC AAA TTG  
 Leu Thr Cys Cys Thr Arg Gly Ile Met Ala Asp Tyr Leu Asn Ser Asp Tyr Arg Tyr Asn Lys Asp Val Asp Leu Asp Leu Val Lys Leu

FIG. 6



1110 1170  
 TTT TTG SAG AAT GGA AAA CCG CAC GGA ATA ATG TGT TGT AST ATT GTA CCA CTA TGG AGA AAT GAT AAG GAA ACC ATC TCT TTG ATA TTG AAA  
 Phe Leu Glu Asn Gly Lys Pro His Gly Ile Met Cys Ser Ile Val Pro Leu Trp Arg Asn Asp Lys Glu Thr Ile Ser Leu Ile Leu Lys

1200 1260  
 ACA ATG AAC TCG GAT GTC CTC CAA CAT ATA CTA ATT GAG TAT ATA ACA TTC AGC GAT ATC GAT ATC TCT CTA GTG GAA TAC ATG TTG GAA  
 Thr Met Asn Ser Asp Val Leu Glu His Ile Leu Ile Glu Tyr Ile Thr Phe Ser Asp Ile Asp Ile Ser Leu Val Glu Tyr Met Leu Glu

1290 1350  
 TAT GGA GCT GTG GTA AAT AAA GAG GCT ATT CAC GGA TAC TTT AAA AAT ATT AAT GAT TCT TAC ACS ATG AAA TAT CTA CTA AAA AAG  
 Tyr Gly Ala Val Val Asn Lys Glu Ala Ile His Gly Tyr Phe Lys Asn Ile Asn Ile Asp Ser Tyr Thr Met Lys Tyr Leu Leu Lys Lys

1380 1440  
 GAA GGG GGA GAT GCC GTC AAT CAT CAT GAT GAT GAT GGA GAG ATC CCG ATT GGA CAC CTA TGT AAA TCC AAC TAT GGA GGT TAT AAT TTC TAC  
 Glu Gly Gly Asp Ala Val Asn His Leu Asp Asp Gly Glu Ile Pro Ile Gly His Leu Cys Lys Ser Asn Tyr Gly Arg Tyr Asn Phe Tyr

1470 1530  
 ACT GAT ACA TAC AGA CAG GGT TTT GBT GAT ATG TCT TAT GCT TGC CCA ATT CTT AGT ACT ATA AAC ATT TGC CTA CCT TAT CTT AAA GAC  
 Thr Asp Thr Tyr Arg Glu Gly Phe Arg Asp Met Ser Tyr Ala Cys Pro Ile Leu Ser Thr Ile Asn Ile Cys Leu Pro Tyr Tyr Leu Lys Asp

1560 1620  
 ATT AAC ATG ATT GAC AAA CCA GGA GAA ACA CTT CTT CAC AAG GCT GGT AGA TAT AAT AAA CAA TCT CTA GTG TCT TTA CTG CTA GAA TCC  
 Ile Asn Met Ile Asp Lys Arg Gly Glu Thr Leu Leu His Lys Ala Val Arg Tyr Asn Lys Glu Ser Leu Leu Leu Glu Ser

1690 1710  
 GGT TCA GAT GTC AAC ATT AGA TCA AAT AAC GGA TAT ACA TGT ATA GCC ATT GCA ATC AAC GAA TCT AGA AAC ATT GAA CTG CTG AAC ATG  
 Gly Ser Asp Val Asn Ile Arg Ser Asn Asn Gly Tyr Thr Cys Ile Ala Ile Ala Ile Asn Glu Ser Arg Asn Ile Glu Leu Leu Asn Met

FIG-6

1740 1800  
CTA TTA TBT CAT AAA CCT ACA TTA GAT TGT GTG ATT GAT TCA TTG AGA GAA ATA TCT AAC ATA GTA GAT AAT GCC TAT GCT ATA AAA CAA  
Leu Leu Cys His Lys Pro Thr Leu Asp Cys Val Ile Asp Ser Leu Arg Glu Ile Ser Asn Ile Val Asp Asn Ala Tyr Ala Ile Lys Glu

1830 1860  
TGT ATT AGA TAT GCC ATG ATT ATA GAT GAC TGT ATA TCG TCT AAG ATT CCA GAG TCC ATA AGT AAA CAC TAT AAT GAT TAT ATA GAT ATT  
Cys Ile Arg Tyr Ala Met Ile Ile Asp Asp Cys Ile Ser Ser Lys Ile Pro Glu Ser Ile Ser Lys His Tyr Asn Asp Tyr Ile Asp Ile

1920 1950  
TGC AAT CAA GAA TTG AAC GAG ATG AAA AAA ATA ATA GTG GGA GGC AAC ACT ATG TTC TCA TTA ATA TTT ACT GAT CAT GGA GCT AAA ATT  
Cys Asn Glu Ile Leu Leu Asn Glu Met Lys Lys Ile Ile Val Ile Val Glu Glu Asn Thr Met Phe Ser Leu Ile Phe Thr Asp His Gly Ala Lys Ile

2010 2070  
ATT CAT CGG TAT GCC AAT AAT CCA GAA TTA CGT GCG TAT TAT GAG TCA AAA CAA AAT AAA ATA TAC GTG GAA GTA TAT GAT ATT GAT TCC  
Ile His Arg Tyr Ala Asn Asn Pro Glu Leu Arg Ala Tyr Tyr Glu Ser Lys Glu Asn Lys Ile Tyr Val Glu Val Tyr Asp Ile Ile Ser

2100 2160  
AAT GCG ATA GTG AAG CAT AAT AAA ATT CAT AAA AAC ATA GAA TCA GTT GAT GAC AAT ACC TAC ATT TCT AAT TTG CCT TAT ACC ATC AAA  
Asn Ala Ile Val Lys His Asn Lys Ile His Lys Asn Ile Glu Ser Val Asp Asp Asn Thr Tyr Ile Ser Asn Leu Pro Tyr Thr Ile Lys

2190 2250  
TAC AAA ATA TTC GAG CAA CAA TAA GTA TTT TTT ATA CCT TTA AAA TTG ATA AAT AAA TTT TTT CTA GTG ATA TTT TGG CAA GAT GAG AAT  
Tyr Lys Ile Phe Glu Glu Glu End

2280  
CCT ATT TCT CAT CGC TTT CAT GTA TGG GTG TGT TCA CTC ATA TGT TAA C

FIG. 6





Office européen  
des brevets

# RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numéro de la demande

EP 87 40 2104

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl. 4)
A	EP-A-O 162 782 (TRANSGENE S.A.) * Page 2, ligne 23 - page 3, ligne 4; page 37, ligne 4 - page 38, ligne 23; figure 7; revendications * & FR-A-84 06 499 (Cat. D)	1-12	C 12 N 15/00 C 07 H 21/04 C 12 N 5/00 C 12 N 7/00
A	--- EP-A-O 110 385 (UNITED STATES OF AMERICA) * Page 2, ligne 13 - page 3, ligne 22; page 5, ligne 25 - page 6, ligne 7; revendications *	1	
A	--- EXPERIENTIA, vol. 38, no. 3, mars 1982, pages 285-297, Birkhäuser Verlag, Basel, CH; R. WITTEK: "Organization and expression of the poxvirus genome" * Paragraphes 2.5,4; figures 4,7 *	1	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl. 4)  C 12 N
A	--- NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 10, no. 18, 1982, pages 5673-5679, IRL Press Ltd, Oxford, GB; B.M. BAROUDY et al.: "Sequence homologies of diverse length tandem repetitions near ends of vaccinia virus genome suggest unequal crossing over" * Résumé; page 5679, lignes 1-8 *	1	
-----			
Le présent rapport de recherche a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 11-11-1987	Examineur YEATS S.M.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons	
& membre de la même famille, document correspondant			